

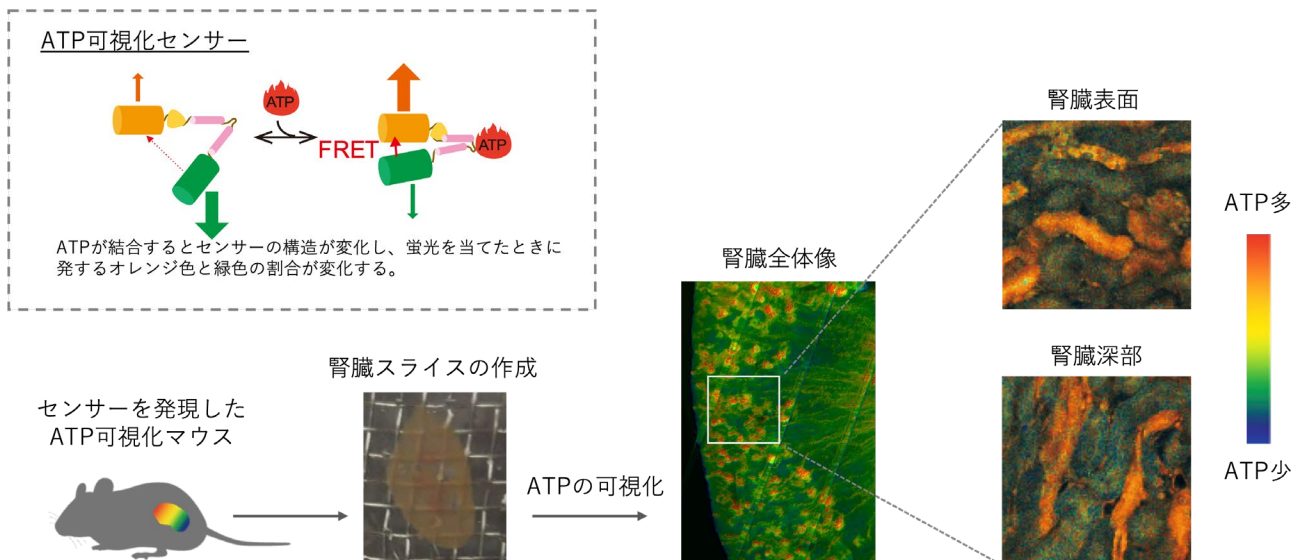
# 腎臓全領域におけるエネルギー動態の可視化

## —腎臓病の病態解明や薬剤開発に役立つ新技術—

### 概要

アデノシン三リン酸 (ATP) は「エネルギー通貨」とも呼ばれ、様々な生命活動に不可欠な分子ですが、その詳細な動態は謎に包まれていました。京都大学医学研究科 腎臓内科学 柳田素子教授 (兼・高等研究院ヒト生物学高等研究拠点 (WPI-ASHBi)主任研究者)、山本恵則 ASHBi 特定研究員 (研究当時、現; 京都大学医学部附属病院 腎臓内科学 特定病院助教) らは、これまでに細胞内 ATP 濃度を可視化するセンサーを全身発現したマウスを作成し、生体腎の ATP 動態を高精度かつリアルタイムに捉えることに成功しました。本研究では、同マウスの腎臓のスライス切片を作成し、独自に改良した培養条件下で観察することで、これまで観察ができなかった腎臓の深部領域を含めた ATP の可視化に成功しました。最近、アメリカ食品医薬品局 (FDA) は医薬品承認のための動物実験要件を撤廃しました。この背景には動物愛護の観点があり、これにより、動物実験を臓器チップやオルガノイドなどの実験で代替できるようになりましたが、代替法はまだ動物実験を完全に代替するには至っておらず、さらなる発展が待たれています。われわれのこの新規システムは、生体に類似した三次元構造と機能性 (トランスポーターによる薬物取り込みなど) を保持しており、さらに 1 つの腎臓から複数のスライスを作成し、複数の実験条件を同時に試験することができることから、動物愛護の観点からも高いポテンシャルを持った実験系だと考えられます。本技術は、腎臓病の原因をエネルギー代謝の観点から解明することや、新規薬剤開発に役立つと考えます。

本成果は、2024 年 7 月 9 日に国際学術誌「*Kidney International*」にオンライン掲載されました。



## 1. 背景

腎臓病は、今や成人の 8 人に 1 人が罹患する新たな国民病とも言われています。その一方で、有効な治療法の開発はまだ遅れており、腎臓の機能が廃絶し透析療法が必要となる患者さんの数は年々増えてきています。そのため腎臓病の病態メカニズムを解明し、新たな治療法を発見することは喫緊の課題だと考えられます。

腎臓は生体内で最も酸素を消費する臓器の一つで、つまりそれは腎臓が非常に多くのエネルギーを産生し消費しているということを意味しています。腎臓の大きな役割として、血液中に蓄積した老廃物や、過剰な水分やミネラルを尿の中に排泄することが挙げられます。腎臓はこの体液の恒常性の維持のために、多量のエネルギーを消費しています。

我々は腎臓病においては、エネルギー不足が起こり、腎臓が機能不全に陥っているのではないかと仮説を立てました。アデノシン三リン酸 (ATP) は全ての生物に共通する「エネルギー通貨」とも呼ばれる重要な分子ですが、これまで次々と産生され、消費されてゆく ATP の動態を可視化する技術がなかったため、その詳細は謎に包まれていました。その謎を解くため、我々はこれまでに、細胞内 ATP 濃度を可視化する FRET<sup>1</sup> バイオセンサーを全身発現させた ATP 可視化マウスを作成しました。ATP 可視化マウスと特殊な顕微鏡を用いることで、ATP の動態を高解像度かつリアルタイムに捉えることに成功しました。しかしながら、この方法の技術的な制約として、腎臓のごく表層の ATP しか評価ができませんでした。腎臓の深部には、血液の濾過の中心的な役割を担う糸球体 (特に重要な細胞が足細胞と呼ばれる) や、腎臓病のメカニズムを理解する上で重要となる部位が存在し、腎臓全領域における評価方法が必要だと考えました。

## 2. 研究手法・成果

本研究では、ATP 可視化マウスの腎臓を取り出し、冷却した培養液の中で、専用の機器を用い 300 $\mu$ m 厚の薄い腎臓のスライス切片を作成しました。我々はまずこの腎臓のスライス切片が、生体内と同様に ATP 産生が保たれるような培養条件を検証し、腎臓の全領域の ATP 動態の観察が可能な系の確立に成功しました。最近、アメリカ食品医薬品局 (FDA) は医薬品承認のための動物実験要件を撤廃しました。この背景には動物愛護の観点があり、これにより、動物実験を臓器チップやオルガノイドなどの実験で代替できるようになりました。しかし現在のところ、代替法はまだ動物実験を完全に代替するには至っておらず、さらなる発展が待たれています。われわれのこの新規システムは、生体に類似した三次元構造と機能性 (トランスポーターによる薬物取り込みなど) を保持しており、さらに 1 つの腎臓から複数のスライスを作成し、複数の実験条件を同時に試験することができることから、動物愛護の観点からも高いポテンシャルを持った実験系だと考えられます。

我々はこの実験系を用い、酸化リン酸化の阻害剤の投与時には 遠位尿細管<sup>2</sup> では ATP がよく保たれるのに対し、近位尿細管<sup>3</sup> では著明に ATP が減少するのが観察されました。一方、解糖系の阻害剤の投与時には足細胞の ATP 低下が最も著明でありました。このようにそれぞれの部位での ATP 産生の仕組みが異なることを明らかにしました。

続いて、我々は腎障害時にどの部位がどのように ATP 変動を起こすのかを観察しました。虚血再灌流モデル<sup>4</sup> を模倣した系においては、虚血を起こすと近位尿細管と遠位尿細管の ATP が速やかに低下し、その後、再灌流後、近位尿細管の ATP 回復は、遠位尿細管と比較して不良であることがわかりました。さらには虚血時間が長くなるほど再灌流後の近位尿細管の ATP の回復は不良であることがわかりました。

これらの現象は動物実験でも同様の所見が観察されており、このスライス培養系が動物内の代謝変化を反映していることがわかります。また抗癌剤であるシスプラチンは副作用として腎障害を引き起こすことが知られていますが、この培養系にシスプラチンを投与すると、濃度依存的に、近位尿細管と遠位尿細管にて ATP の低下を認め、他の領域での ATP 低下は軽微に留まることがわかりました。

### 3. 波及効果、今後の予定

この新しい ATP 可視化技術を用いて、虚血再灌流モデルやシスプラチン腎症モデルだけでなく、様々な腎障害モデルで ATP 動態の観察・解析を進める予定です。今回の実験では、腎臓スライスを作成したあとに、培養下でさまざまな障害を与えましたが、マウスに障害モデルを惹起したあとに、腎臓のスライス切片を作成することで、エネルギー動態を解析することも可能です。従来からあるメタボローム解析や質量分析イメージングといった代謝解析方法と本研究の ATP 可視化技術とが相互補完することで、腎臓病の創薬開発において今後、重要なツールとなることが期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は以下の資金の援助を受けて行われました（以下、研究開発代表者：柳田素子）。

- ・国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）・革新的先端研究開発支援事業（AMED－CREST）「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域における研究開発課題「腎臓病において組織障害と修復を制御する微小環境の解明と医学応用」、腎疾患実用化研究事業「ヒト腎臓病における 3 次リンパ組織の役割の解明と治療介入対象としての蓋然性の検討」、健康・医療分野におけるムーンショット型研究開発等事業「炎症誘発細胞除去による 100 歳を目指した健康寿命延伸医療の実現」、橋渡し研究戦略的推進プログラム「アカデミア発先端医療技術の早期実用化に向けた実践と連携」、老化メカニズムの解明・制御プロジェクト 個体・臓器老化研究拠点
- ・文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「腎構成細胞「亜集団」の細胞老化が腎臓の老化と障害応答性に与える影響の解明」
- ・文部科学省科学研究費助成事業新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「先端バイオイメージング支援プラットフォーム」

#### <用語解説>

1. FRET (Fluorescence resonance energy transfer)：蛍光共鳴エネルギー移動の略称。本システムでは、細胞内 ATP が高い時に蛍光共鳴エネルギー移動という現象が起こり、顕微鏡で感知できる緑色とオレンジの蛍光色の強度の割合が変化することで ATP 量が検出される仕組みとなっています。

2.3. 近位尿細管、遠位尿細管：腎臓に入った血液は最初に糸球体という場所で濾過され、尿の元となる原尿が作られます。原尿はその後、最初に近位尿細管、その後に遠位尿細管を通過し、最終的に本当に不要なものだけが尿として体外に排泄されます。原尿中の水、電解質、アミノ酸、糖などの多くのものは重要な物質なので、尿細管を通過する間に再吸収されます。

4. 虚血再灌流モデル：腎障害を引き起こす最も一般的な手法と知られます。生体では腎動・静脈を一定時間遮断したのち、血流を再開（再灌流）させることで腎障害を惹起します。スライス培養では、培養液

中の酸素や、栄養素を抜くことで虚血に似た状態を模倣します。

#### <研究者のコメント(山本恵則)>

現代においても、腎機能を改善させる画期的な薬剤の開発は未だに困難な状況です。その原因として、腎臓が多種多様な細胞から構成され、腎臓の機能はそれらの細胞間の複雑な相互作用のバランスの上で成り立っているからだと考えられます。本技術に限らず、複数の細胞の機能を経時的に解析できる実験手法は、今後も重要になると考えられます。腎臓病や透析で苦しむ患者さんが減るよう、引き続き、病気の根本的な原因解明を目指して研究・診療に取り組んでいきたいと考えています。

#### <論文タイトルと著者>

タイトル： Visualization of intracellular ATP dynamics in different nephron segments under pathophysiological conditions using the kidney slice culture system (腎スライス培養系を用いた、病態生理下での異なるネフロンセグメントにおける細胞内 ATP 動態の可視化)

著者： Shigenori Yamamoto, Shinya Yamamoto, Masahiro Takahashi, Akiko Mii, Akihiro Okubo, Naoya Toriu, Shunsaku Nakagawa, Takaaki Abe, Shingo Fukuma, Hiromi Imamura, Masamichi Yamamoto, Motoko Yanagita

掲載誌： *Kidney International* DOI : <https://doi.org/10.1016/j.kint.2024.05.028>